

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ загрузки экзосом малыми некодирующими РНК.

Изобретение относится к молекулярной биологии, в частности, к способам загрузки (заполнения) экзосом малыми некодирующими РНК, для возможности их последующей таргетной доставки в отдельные ткани живых организмов.

Известен способ загрузки экзосом антацианидинами [патент WO2014134132 A1 Milk-derived microvesicle compositions and related methods], где экзосомы получают из коровьего молока, далее обрабатывают их микроРНК, что в результате позволяет использовать экзосомы в качестве транспортеров микроРНК с перспективой их применения при лечении различных заболеваний. Данный метод имеет следующие недостатки: 1) в известном способе используются экзосомы из коровьего молока, что не позволит достигнуть высокой эффективности доставки в отдельные ткани человека. Ввиду различия в белковых последовательностях, коровьи экзосомы могут восприниматься человеческим организмом как чужеродные и не проникать в некоторые органы и ткани достаточно эффективно по сравнению с человеческими экзосомами. 2) в известном способе не представлены данные по максимальной эффективности загрузки молекул микроРНК, а учитывая потенциал ее дальнейшего терапевтического использования и достаточно высокую стоимость синтеза данных молекул, эффективная загрузка может быть существенным фактором для практического применения микроРНК загруженных в экзосомы.

Техническим эффектом, достигаемым при реализации заявленного способа является возможность максимальной загрузки экзосом, полученных из биологических жидкостей человека малыми

некодирующими микроРНК, что в дальнейшем позволит использовать загруженные экзосомы в качестве транспортных структур для доставки терапевтических агентов в опухолевые клетки живых организмов.

Вышеприведенный технический результат достигается тем, что в забуференном фосфатом физиологическом растворе (PBS), смешивают экзосомы, полученные из мочи или периферической венозной крови человека и малую некодирующую РНК в соотношении на 1 мл раствора $1 \cdot 10^{10} \div 5 \cdot 10^{10}$ экзосом и $10 \cdot 10^{12} \div 50 \cdot 10^{12}$ копий малой некодирующей РНК, далее полученную смесь выдерживают в термостате при 35-40 °C в течение 14-18 часов.

После проведения инкубирования веществ необходим этап ультрацентрифугирования с целью отделения экзосом с загруженным веществом – в процессе ультрацентрифугирования они сформируют осадок на дне пробирки – от загружаемого свободного вещества, которое в процессе ультрацентрифугирования останется в растворе (супернатанте).

Ультрацентрифугирование предпочтительно проводить в режиме 100000 g в течение 2-х часов, что обеспечивает максимальное осаждение содержащихся в растворе загруженных экзосомы.

Пример 1

Предварительно полученные методом градиентного ультрацентрифугирования на сахарозе из мочи человека объёмом 100 мл экзосомы в количестве $10 \cdot 10^{10}$ и $80 \cdot 10^{12}$ копий малой некодирующей РНК hsa-mir-34a были смешаны в 8 мл PBS. Полученную смесь разделили на 8 проб по 1 мл: первую пробу оставили в термостате при 40 °C на 10 часов, вторую пробу оставили в термостате при 40 °C на 12 часов, третью пробу оставили в термостате при 40 °C на 14 часов, четвёртую пробу оставили в термостате при 40 °C на 16 часов, пятую пробу оставили в

термостате при 40 °С на 18 часов, шестую пробу оставили в термостате при 40 °С на 20 часов, седьмую пробу оставили в термостате при 40 °С на 22 часа и восьмую пробу оставили в термостате при 40 °С на 24 часа. По истечение соответствующего времени инкубации проводили

5 ультрацентрифугирование пробы при 100000g в течение 2 часов, после чего полученный осадок разводили в 1 мл PBS, проводили 3 цикла заморозки-разморозки с целью разрушения экзосом и получения свободной молекулы-маркера (малая не кодирующая РНК has-mir-34a) с последующей постановкой ПЦР в реальном времени. В результате,

10 концентрация малой не кодирующей РНК hsa-mir-34a в 3-ей, 4-ой и 5-ой пробах, оказалась наиболее высокой. Из таблицы №1 наглядно видно что идет плавный подъем концентрации загруженной микроРНК достигая максимальных значений в 3-ей, 4-ой и 5-ой пробах, после чего следует плавный спад, что свидетельствует о наиболее эффективном времени

15 инкубации в интервале 14-18 часов.

Таблица №1 Влияние времени инкубации на эффективность загрузки микроРНК в экзосомы.

Проба и время инкубации	№1 10ч	№2 12ч	№3 14ч	№4 16ч	№5 18ч	№6 20ч	№7 22ч	№8 24ч
Концентрация малой не кодирующей РНК hsa-mir-34a (копий/мл)	1,89 *10 ¹²	2,12 *10 ¹²	2,84 *10 ¹²	2,97 *10 ¹²	2,87 *10 ¹²	2,51 *10 ¹²	2,38 *10 ¹²	2,05 *10 ¹²

Пример 2

Предварительно полученные методом градиентного ультрацентрифугирования на сахарозе из мочи человека объёмом 100мл экзосомы в количестве $2 \cdot 10^9$ и $10 \cdot 10^{12}$ копий малой некодирующей РНК hsa-mir-122 были смешаны в 1 мл PBS (образец №1). Также были

5 получены образцы с концентрацией экзосом $1 \cdot 10^{10}$ (образец №2), с концентрацией экзосом $5 \cdot 10^{10}$ (образец №3) и с концентрацией экзосом $25 \cdot 10^{10}$ (образец №4). Полученные образцы оставили в термостате при 40°C на 16 часов. По истечении соответствующего времени инкубации проводили ультрацентрифугирование проб при $100000g$ в течение 2 часов,

10 после чего полученный осадок разводили в 1 мл PBS, проводили 3 цикла заморозки-разморозки с целью разрушения экзосом и получения свободной молекулы-маркера (малая некодирующая РНК hsa-mir-122) с последующей постановкой ПЦР в реальном времени. В результате, концентрация малой некодирующей РНК hsa-mir-122 во 2-ой и 3-ей

15 пробах, оказалась наиболее высокой. Из таблицы №2 наглядно видно что идет плавный подъем концентрации загруженной микроРНК достигая максимума во 2-ой и 3-ей пробах, после чего следует плавный спад, что свидетельствует о оптимальной концентрации экзосом в интервале $1 \cdot 10^{10}/\text{мл} \div 5 \cdot 10^{10}/\text{мл}$.

20 Таблица №2 Влияние концентрации экзосом на эффективность загрузки микроРНК.

Проба и концентрация экзосом	№1 $2 \cdot 10^9/\text{мл}$	№2 $1 \cdot 10^{10}/\text{мл}$	№3 $5 \cdot 10^{10}/\text{мл}$	№4 $25 \cdot 10^{10}/\text{мл}$
Концентрация малой некодирующей РНК hsa-mir-122 (копий/мл)	1,37 $\cdot 10^{12}$	2,79 $\cdot 10^{12}$	2,97 $\cdot 10^{12}$	2,24 $\cdot 10^{12}$

Пример 3

Предварительно полученные методом градиентного ультрацентрифугирования на сахарозе из мочи человека объемом 100мл экзосомы в количестве $30 \cdot 10^{10}$ и $60 \cdot 10^{12}$ копий малой некодирующей РНК hsa-mir-16 были смешаны в 6 мл PBS. Полученную смесь разделили на 6 проб по 1 мл: первую пробу оставили в термостате при 25 °C на 16 часов, вторую пробу оставили в термостате при 30 °C на 16 часов, третью пробу оставили в термостате при 35 °C на 16 часов, четвертую пробу оставили в термостате при 40 °C на 16 часов, пятую пробу оставили в термостате при 45 °C на 16 часов и шестую пробу оставили в термостате при 50 °C на 16 часов. По истечении соответствующего времени инкубации проводили ультрацентрифугирование пробы при 100000g в течение 2 часов, после чего полученный осадок разводили в 1 мл PBS, проводили 3 цикла заморозки-разморозки с целью разрушения экзосом и получения свободной молекулы-маркера (малая некодирующая РНК hsa-mir-16) с последующей постановкой ПЦР в реальном времени. В результате, концентрация малой некодирующей РНК hsa-mir-16 в 3-ей и 4-ой пробах, оказалась наиболее высокой. Из таблицы №3 наглядно видно что идет плавный подъем концентрации загруженной микроРНК достигая максимума в 3-ей и 4-ой пробах, после чего следует плавный спад, что свидетельствует о наиболее эффективной температуре инкубации в интервале 35-40°C.

Таблица №3 Влияние температуры инкубации на эффективность загрузки микроРНК в экзосомы.

Проба и время инкубации	№1 25 °C	№2 30 °C	№3 35 °C	№4 40 °C	№5 45 °C	№6 50 °C
Концентрация	0,78	1,88	2,79	2,84	2,11	1,91

малой некодирующей РНК hsa-mir- 16 (копий/мл)	$*10^{12}$	$*10^{12}$	$*10^{12}$	$*10^{12}$	$*10^{12}$	$*10^{12}$
--	------------	------------	------------	------------	------------	------------

Пример 4

Предварительно полученные методом градиентного ультрацентрифугирования на сахарозе из мочи человека объёмом 100мл экзосомы в количестве $5*10^{10}$ и $1*10^{12}$ копий малой некодирующей РНК hsa-mir-122 были смешаны в 1 мл PBS (образец №1). Также были получены образцы с концентрацией малой некодирующей РНК $10*10^{12}$ копий (образец №2), с концентрацией малой некодирующей РНК $50*10^{10}$ (образец №3) и с концентрацией малой некодирующей РНК $100*10^{12}$ (образец №4). Полученные образцы оставили в термостате при 40 °C на 16 часов. По истечении соответствующего времени инкубации проводили ультрацентрифугирование проб при 100000g в течение 2 часов, после чего полученный осадок разводили в 1 мл PBS, проводили 3 цикла заморозки-разморозки с целью разрушения экзосом и получения свободной молекулы-маркера (малая некодирующая РНК hsa-mir-122) с последующей постановкой ПЦР в реальном времени. В результате, процент загруженной в экзосомы малой некодирующей РНК hsa-mir-122 во 2-ой и 3-ей пробах, оказался наиболее высоким. Из таблицы №1 наглядно видно что идет плавный подъем процента загруженной микроРНК достигая максимума во 2-ой и 3-ей пробах, после чего следует плавный спад, что свидетельствует о оптимальной концентрации малой некодирующей РНК в интервале $10*10^{12}/мл \div 50*10^{12}/мл$.

Таблица №4 Влияние концентрации малой некодирующей микроРНК на эффективность загрузки.

Проба	и	№1	№2	№3	№4
-------	---	----	----	----	----

концентрация малой некодирующей РНК	$1 \cdot 10^{12}/\text{мл}$	$10 \cdot 10^{12}/\text{мл}$	$50 \cdot 10^{12}/\text{мл}$	$100 \cdot 10^{12}/\text{мл}$
% загруженной в экзосомы малой некодирующей РНК hsa-mir- 122	25%	28%	30%	16%

Следует отметить что может использоваться любой тип малых некодирующих РНК, с любой нуклеотидной последовательностью, и это не влияет на качество загрузки, а конкретная микроРНК выбирается только исходя из поставленных задач.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ загрузки экзосом малыми некодирующими РНК, при котором в забуференном фосфатом физиологическом растворе (PBS), смешивают экзосомы, полученные из мочи или периферической венозной крови человека и малую некодирующую РНК в соотношении на 1 мл раствора 1*10¹⁰÷5*10¹⁰ экзосом и 10*10¹²÷50*10¹² копий малой некодирующей РНК, далее полученную смесь выдерживают в термостате при 35-40 °С в течение 14-18 часов.